

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-104230

(43)Date of publication of application : 24.04.1998

(51)Int.Cl.

G01N 33/50
C12Q 1/68
G01N 33/53
G01N 33/532

(21)Application number : 08-280066

(71)Applicant : AISIN SEIKI CO LTD
TOYOTA CENTRAL RES & DEV LAB INC

(22)Date of filing : 30.09.1996

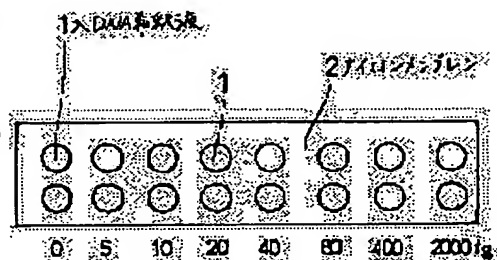
(72)Inventor : FUJITA SATOSHI
KAGIYAMA NAOTO
MOMIYAMA MASAYOSHI
KONDO YASUMITSU
NISHIYANAI YOSHIHO
YAMADA YUKIO
ASAMI OSAMU
SUGIYAMA HIDEHIKO

(54) METHOD OF DETECTING NUCLEIC ACID OR THE LIKE, AND LABELED SUBSTANCE AND DETECTED SUBSTANCE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To solve the disadvantage in safety of isotope method and detect nucleic acid or the like with high sensitivity by coupling a labeled substance having a linker with the number of atoms equal to or larger than 10 and gibberellin or hapten of its derivative with a subject.

SOLUTION: A4-[15]-dUTP which is a coupled body of hapten and linker is synthesized by a prescribed treatment, and a subject λ DNA is labeled with this. A λ DNA diluted solution 1 is spotted in each prescribed quantity on a nylon membrane 2, and DNA is immobilized by ultraviolet rays emission. It is then reacted with a fluorescent substrate after a prescribed treatment, an excited light is emitted to detect the fluorescent from each spot. When it is compared with the result of the similar λ DNA detection by use of digoxigenin-11-dUTP instead of gibberellin A4-[15]-dUTP, the gibberellin-labeled λ DNA can be sufficiently detected even in an extremely trace amount, but the digoxigenin-labeled λ DNA can not be detected up to 40fg.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of

rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-104230

(43) 公開日 平成10年(1998) 4月24日

(51) Int.Cl.⁸

識別記号

F I

G 0 1 N 33/50

G 0 1 N 33/50

P

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/53

J

33/532

33/532

A

審査請求 未請求 請求項の数 9 F D (全 8 頁)

(21) 出願番号

特願平8-280066

(22) 出願日

平成 8 年 (1996) 9 月 30 日

(71) 出願人 000000011

アイシン精機株式会社

愛知県刈谷市朝日町 2 丁目 1 番地

(71) 出願人 000003609

株式会社豊田中央研究所

愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道 41 番
地の 1

(72) 発明者 藤田 聡

愛知県刈谷市八軒町 5 丁目 50 番地 株式会
社アイシン・コスモス研究所内

(74) 代理人 弁理士 高橋 祥泰

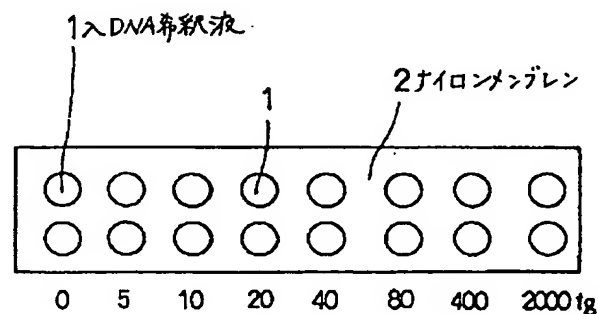
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸等の検出方法、並びに標識物質及び検出物質

(57) 【要約】

【課題】 アイトープ法の安全上の欠点を解消し、検出感度に優れた、核酸等の検出方法、並びに標識物質及び検出物質を提供する。

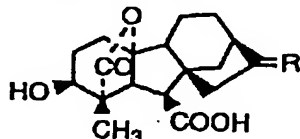
【解決手段】 核酸、蛋白質等の被検体に、リンカーとハプテンとを有する標識物質を結合する。標識物質におけるハプテンに、抗ハプテン抗体を有し且つシグナルを発生し得る検出物質を結合する。検出物質よりシグナルを発生させ、該シグナルを検出する。ハプテンは、ジベレリン又はその誘導体である。リンカーは、原子数が 10 以上であり且つ直鎖状に配列した原子鎖を有する。検出物質は、抗ハプテン抗体と結合してなり、且つシグナル発生基質との反応により該シグナル発生基質よりシグナルを発生させ得る酵素であること、又は自らシグナルを発生し得るシグナル発生化合物であることが好ましい。



(2)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸、蛋白質等の被検体に、リンカーとハブテンとを有する標識物質を結合し、次いで、上記標識物質におけるハブテンに、抗ハブテン抗体を有し且つシグナルを発生し得る検出物質を結合し、次いで、上記検出物質よりシグナルを発生させ、該シグナルを検出する、核酸等の検出方法であって、上記ハブテンは、ジベ*



*レリン又はその誘導体であり、上記リンカーは、原子数が10以上であることを特徴とする核酸等の検出方法。

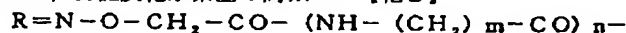
【請求項2】 請求項1において、上記ハブテンは、下記の「化1」に示されるものであることを特徴とする核酸等の検出方法。

【化1】

R: リンカー

【請求項3】 請求項1又は2において、上記リンカーは、非環式炭化水素、単環式炭化水素、架橋環式炭化水素、スピロ炭化水素、環集合炭化水素、及び側鎖を有する環式炭化水素のグループから選ばれる1種又は2種以上からなる炭化水素基を有し、原子数が10以上であり且つ直鎖状に配列した原子鎖を有することを特徴とする核酸等の検出方法。

【請求項4】 請求項3において、上記炭化水素基の間※²⁰



※は、アルキル、エーテル、アミド、エステル、アゾ、ニトリル、ニトロ、及びアミノのグループから選ばれる1種又は2種以上の原子団により連結されていることを特徴とする核酸等の検出方法。

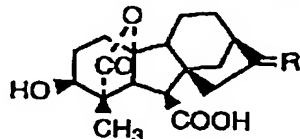
【請求項5】 請求項1～4のいずれか一項において、上記リンカーは、下記の「化2」の一般式により示されることを特徴とする核酸等の検出方法。

【化2】

m=1~10、n=1~10

【請求項6】 請求項1～5のいずれか一項において、上記検出物質は、上記抗ハブテン抗体と、シグナル発生基質と反応して該シグナル発生基質よりシグナルを発生させ得る酵素とからなることを特徴とする核酸等の検出方法。

【請求項7】 請求項1～5のいずれか一項において、上記検出物質は、上記抗ハブテン抗体と、自らシグナルを発生し得るシグナル発生化合物とからなることを特徴★



R: リンカー

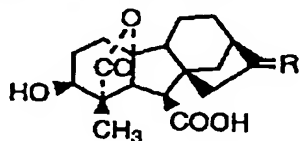
★とする核酸等の検出方法。

【請求項8】 核酸、蛋白質等の被検体を標識し、且つシグナルを発生し得る検出物質と結合するための標識物質において、上記標識物質は、下記の「化1」に示される、ハブテンとリンカーとを有してなり、該リンカーは、原子数が10以上であり且つ直鎖状に配列した原子鎖を有することを特徴とする標識物質。

【化1】

R: リンカー

【請求項9】 核酸、蛋白質等の被検体を検出するための検出物質において、上記検出物質は、上記被検体を標識した下記の「化1」に示された標識物質のハブテンに対して、抗原抗体反応により結合する抗ハブテン抗体 ☆



R: リンカー

☆と、シグナル発生基質と反応し得る酵素とよりなることを特徴とする検出物質。

【化1】

【発明の詳細な説明】

【0001】

【技術分野】本発明は、分子生物学、生化学などの基礎

研究分野、臨床検査、環境中微生物の検出等の応用分野

(3)

3

において利用できる、核酸等の検出方法並びに、その検出において用いる標識物質及び検出物質に関する。

【0002】

【従来技術】医学、生物学の分野においては、近年、核酸断片検出法により、核酸配列を検出する方法が多用されている。現在、広く用いられている検出方法としては、核酸プローブを放射性同位元素を用いて標識し、これと標的核酸とをハイブリダイズさせ、しかる後にオートラジオグラフィにより標的核酸の検出を行うアイソトープ法がある。

【0003】しかし、アイソトープ法には、多くの欠点がある。その欠点とは、

①アイソトープにより映しだされた像はぼやけることがあり、空間的解像力が低い。そのため、核酸ハイブリダイゼーションにおいて、近接した遺伝子同志が重なってみえてしまい、遺伝子間の相対的位置関係を明らかにすることができない場合がある。

②放射性同位体は放射能漏れのおそれがあるため、放射能漏れを防止するための特別の設備を備えたアイソトープ実験室の中でしか実験できない。

③人体が受ける影響が大きい。

【0004】④検出時間が数週間から数カ月と非常に長いため、迅速臨床診断への応用が困難である。

⑤放射性同位体の放射活性は、一定の半減期をもって減衰するため、放射性同位体の購入予定に合わせた実験計画をたてる必要がある。また、わずかな日程のずれによって、放射性同位体や大規模な実験成果を無駄にするおそれがある。

⑥放射性同位体は、極めて高価である。

【0005】かかる背景からアイソトープ法に代わる、核酸プローブへの標識法が、従来、開発されている。例えば、DNAラベリングキット（ペーリンガー社製）は、ハプテンとしてディゴキシゲニンを用いている

(K. Muhlegger et. al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 371, 953 (1990))。しかし、上記DNAラベリングキットの検出感度は40fg (4×10^{-14} g) DNAであり、アイソトープ法の検出感度に比べて劣っている。

【0006】本発明はかかる従来の問題点に鑑み、アイソトープ法の安全上の欠点を解消し、検出感度に優れた、核酸等の検出方法、並びに標識物質及び検出物質を提供しようとするものである。

【0007】

【課題の解決手段】請求項1の発明は、核酸、蛋白質等の被検体に、リンカーとハプテンとを有する標識物質を結合し、次いで、上記標識物質におけるハプテンに、抗ハプテン抗体を有し且つシグナルを発生し得る検出物質

4

を結合し、次いで、上記検出物質よりシグナルを発生させ、該シグナルを検出する、核酸等の検出方法であって、上記ハプテンは、ジベレリン又はその誘導体であり、上記リンカーは、原子数が10以上であることを特徴とする核酸等の検出方法である。

【0008】本発明において最も注目すべきことは、核酸等の被検体に、リンカーとハプテンとを有する標識物質を結合させることである。

【0009】次に、本発明の作用及び効果について説明する。本発明において、上記リンカーは、ハプテンと被検体との間を連結する連結材である。リンカーは、原子数が10以上である。そのため、リンカーは長い構造を有していることとなる。それ故、被検体とハプテンとの距離を十分に離すことができる。そのため、抗ハプテン抗体は、ハプテンとの抗原抗体反応により結合する際に、被検体による立体障害を受けにくくなり、ハプテンと接触する機会が多くなり、結合反応を起こしやすくなる。

【0010】それ故、ハプテンを有する標識物質は、抗ハプテン抗体を有する検出物質と効率良く結合する。このため、被検体には多量の検出物質が結合することとなり、検出物質から強いシグナルを発生させることができる。従って、従来の非アイソトープ法に比べて優れた検出感度を発揮することができ、少量の被検体でも十分に検出することができる。

【0011】また、本発明においては、ハプテンとしてジベレリン又はその誘導体を用いている。ジベレリン又はその誘導体は、抗ハプテン抗体としての抗ジベレリンとの親和力が大きい。そのため、ハプテンと抗ハプテン抗体との結合効率が高く、被検体に対して効率よく検出物質を結合することができる。従って、本発明によれば、検出物質から、強いシグナルを発生させることができ、高い検出感度を得ることができる。

【0012】また、本発明によれば、DNA、RNA等の核酸、酵素、ホルモン、ペプチド、蛋白質、糖類、脂質、ビタミン、細胞、微生物、動植物組織等、生体物質のあらゆる物質を被検体として検出することができる。

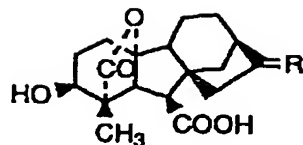
【0013】次に、上記ハプテンは、ジベレリンであることが好ましく、とりわけ、請求項2の発明のように、下記の「化1」に示されるジベレリンA4であることが好ましい。これにより、ハプテンと抗ハプテン抗体との親和力を更に高くすることができる。そのため、上記のように被検体に効率よく検出物質を結合させることができる。従って、更に強いシグナルを発生させることができ、検出感度を一層高くすることができる。

【0014】

【化1】

(4)

5

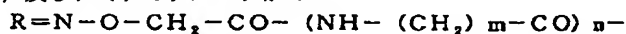


6

R: リンカー

【0015】次に、請求項3の発明のように、上記リンカーは、非環式炭化水素、単環式炭化水素、架橋環式炭化水素、スピロ炭化水素、環集合炭化水素、及び側鎖を有する環式炭化水素のグループから選ばれる1種又は2種以上からなる炭化水素基を有し、原子数が10以上であり且つ直鎖状に配列した原子鎖を有することが好ましい。これにより、被検体とハプテンとの距離を離すことができ、ハプテンと抗ハプテン抗体との反応の際における、被検体による立体障害を更に抑制できる。

【0016】次に、請求項4の発明のように、上記炭化水素基の間は、アルキル、エーテル、アミド、エステル、アゾ、ニトリル、ニトロ、及びアミノのグループか*



*ら選ばれる1種又は2種以上の原子団により連結されていることが好ましい。これにより、リンカーの中の原子団の間を直線状に結合でき、リンカーの長さを長くすることができる。そのため、ハプテンと抗ハプテン抗体との反応の際における、被検体による立体障害を更に抑制できる。

【0017】次に、請求項5の発明のように、上記リンカーは、下記の「化2」の一般式により示されるものであることが好ましい。

【0018】

【化2】

m=1~10, n=1~10

【0019】これにより、リンカーの全体長さを長くすることができる。そのため、ハプテンと抗ハプテン抗体との反応の際における、被検体による立体障害を更に抑制できる。

【0020】また、被検体に標識物質を結合する際に、被検体と結合可能な結合部位を有することが好ましい。かかる結合部位は、被検体の種類によって異なる。例えば、被検体がDNAの場合には、結合部位としては、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、dUTP等を用いることができる。また、蛋白質の場合には、アミノ基を有するリジン等を用いることができる。

【0021】次に、請求項6の発明のように、上記検出物質は、上記抗ハプテン抗体と、シグナル発生基質と反応して該シグナル発生基質よりシグナルを発生させ得る酵素とからなることが好ましい。これにより、容易且つ迅速に検出することができる。

【0022】次に、上記酵素は、アルカリ性ホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、エステラーゼ、パーオキシダーゼ、及び糖鎖切断酵素のグループから選ばれる1種又は2種以上であることが好ましい。これにより、強いシグナルを発生させることができ、シグナルの検出を容易に行うことができる。

【0023】次に、上記シグナル発生基質は、化学発光

R: リンカー

基質、発色基質、蛍光基質、生物発光基質、又は電気発生基質のいずれかであることが好ましい。これらの酵素はシグナル発生基質との反応性が高いため、強いシグナルを発生させることができ、検出感度が更に高くなるからである。

【0024】次に、請求項7の発明のように、上記検出物質は、上記抗ハプテン抗体と、自らシグナルを発生し得るシグナル発生化合物とからなることが好ましい。これにより、容易且つ迅速に検出することができる。上記シグナル発生化合物は、蛍光物質又は発色物質であることが好ましい。これらのシグナル発生化合物は強いシグナルを発生させる。また、シグナルの検出を容易に行うことができる。

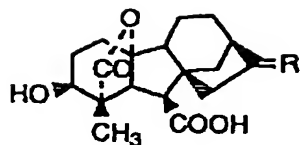
【0025】次に、請求項8の発明は、核酸、蛋白質等の被検体を標識し、且つシグナルを発生し得る検出物質と結合するための標識物質において、上記標識物質は、下記の「化1」に示される、ハプテンとリンカーとを有してなり、該リンカーは、原子数が10以上であり且つ直鎖状に配列した原子鎖を有することを特徴とする標識物質である。

【0026】

【化1】

(5)

7

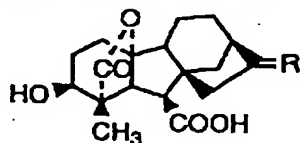


8

R: リンカー

【0027】上記標識物質は、上記のごとく長い原子鎖を有するリンカーをハプテンと結合されたものである。そのため、被検体とハプテンとの距離を離し、被検体による立体障害の影響を少なくすることができる。また、ハプテンとして、上記ジベレリンA4を用いている。上記ジベレリンA4は、抗ハプテン抗体との親和力の高い。それ故、標識物質は、被検体に対して、抗ハプテン抗体を有する検出物質を多量に付着させることができ、感度を著しく上昇させることができる。

【0028】また、上記標識物質は、被検体と結合可能*

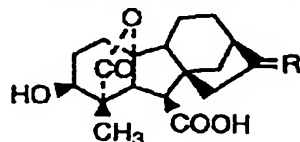


R: リンカー

【0031】上記検出物質は、上記ジベレリンA4に対する抗ハプテン抗体を有するため、ジベレリンA4を有する標識物質に高効率で結合することができる。それ故、酵素とシグナル発生基質との反応によって、強いシグナルを発生させることができ、検出感度が高い。

【0032】

【発明の実施の形態】本発明の実施形態例にかかる核酸等の検出方法について、図1を用いて説明する。本例は、蛍光法によるλDNAの検出方法である。検出方法の概要は、まず、被検体であるλDNAに、リンカーとジベレリンA4とからなる標識物質を結合する。次いで、標識物質に、アルカリ性ホスファターゼを標識した抗ジベレリンA4抗体からなる検出物質を結合する。次いで、アルカリ性ホスファターゼに蛍光基質を反応さ※



R: リンカー

【0035】次に、本例の検出方法の詳細について説明する。

(1) 標識物質の合成

①ジベレリンA4誘導体の合成

100mlのナスフラスコ中で、ジベレリンA4を332mg (1mmol) をテトラヒドロフラン/H₂O (重量比; 1:1) 35mlに溶解し、これに酸化オスミウム19mg (0.1mmol) を氷冷しながら加えた。10分攪拌後、過ヨウ素酸ナトリウム427.8mg (2mmol) を加え、アルゴンガス封入後、室温で17時間攪拌して、反応させた。反応液の沈殿物を濾別

*な結合部位を有することが好ましい。かかる結合部位は、上記のごとく被検体の種類によって異なる。

【0029】次に、請求項9の発明は、核酸、蛋白質等の被検体を検出するための検出物質において、上記検出物質は、上記被検体を標識した下記の「化1」に示された標識物質のハプテンに対して、抗原抗体反応により結合する抗ハプテン抗体と、シグナル発生基質と反応し得る酵素とよりなることを特徴とする検出物質である。

【0030】

【化1】

※せ、次いで励起光を照射して蛍光を発生させ、蛍光を検出する。

【0033】リンカーとしては、アミノ-O-メチルアミドカブロン酸の塩酸塩を用いた。ジベレリンA4とリンカーとからなる標識物質の化学式は、「化1」に示した。本例において、「化1」の中のリンカー(R)は、N-O-メチルアミドカブロン酸-[5-(アミドアリル)-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸]-四ナトリウム塩である。リンカーの先端部分に結合しているデオキシウリジン-5'-三リン酸(dUTP)は、被検体であるλDNAとの結合部位である。

【0034】

【化1】

し、濾液を減圧濃縮して、テトラヒドロフランを留去して水溶液を得た。

【0036】この水溶液に、6規定の硫酸を加えて、pH=1.5に調整し、酢酸エチルで3回抽出して、150mlの酢酸エチル抽出液を得た。得られた酢酸エチル抽出液に、無水硫酸ナトリウムを加えて、放置し、脱水した後、無水硫酸ナトリウムを濾別し、濾液を濃縮した。

【0037】上記濃縮濾液を、シリカゲル吸着カラムクロマトグラフィで精製した。溶出液として、クロロホルム-酢酸エチル系を用い、クロロホルム100%から酢

9

酸エチルを5%刻みで増やすステップワイズ溶出を行った。1ステップ当たり、20mlずつ溶出させてこれを分取した。ジベレリンA4-17-ノルケトンを含むフラクションを回収し、溶媒留去すると、ジベレリン誘導体であるジベレリンA4-17-ノルケトンを、収率55%で得た。この化合物は、 $^1\text{H-NMR}$, IR, MSスペクトルにより構造を確認した。

【0038】②アミノ-O-メチルアミドカブロン酸の塩酸塩の合成

100mlのナス型フラスコに、出発原料としてカルボキシメトキシアミンヘミハイドロクロライドを2.072g (10.9mmol) 入れ、氷冷後飽和炭酸水素ナトリウム20ml/テトラヒドロフラン10mlの混合溶媒を加え、0℃で、10分間攪拌した。出発原料は、すぐに溶解するが、水とテトラヒドロフランは混合溶媒と混ざらないため、2相系で反応を行った。

【0039】次いで、氷冷したまま10分ごとに3回に分けてベンジルカルボニルクロライド2.229g (13.1mmol) を加えた。次いで、氷冷したまま1時間攪拌して、反応させた。反応後、反応液を減圧濃縮し、テトラヒドロフランを留去して水溶液を得た。この水溶液に、1規定の塩酸を加えて酸性となし、塩化メチレンで3回抽出して、合計150mlの塩化メチレン抽出液を得た。塩化メチレン抽出液を無水硫酸ナトリウムを加え、放置し脱水し、その後無水硫酸ナトリウムを濾別し、濾液を濃縮した。これにより、第1中間体であるベンジルアミドカルボン酸を収率83.2%で得た。この化合物は、 $^1\text{H-NMR}$, IR, MSスペクトルによる構造を確認した。

【0040】次に、30mlナス型フラスコに上記第1中間体を258mg (0.8mmol) を入れ、フラスコ内の空気をアルゴンガスで置換した後、脱水蒸留したアセトニトリル溶媒を2.5ml加え、溶解させた。次いで、室温のまま、N-ヒドロキシスクシンイミド93mg (0.8mmol) を脱水アセトニトリル200μlに溶解させた溶液を加えた。更に続いて、DCC (N, N'-Dicyclohexylcarbodiimideを意味する。以下、同様である。) 170mg (0.8mmol) を脱水アセトニトリル500μlに溶解させた溶液を加え、室温で18時間攪拌した。薄相クロマトグラフィーにより第2中間体であるスクシンイミド体を確認し、精製せずに次の反応に用いた。

【0041】次に、上記第2中間体が脱水アセトニトリル溶液に溶解している溶液に、6-アミノヘキサン酸104.9mg (0.8mmol) をメタノール5mlとpH=9.0のバッファー50滴の混合溶媒に溶解させ、その溶液を室温で加えた。次いで、室温で5分間攪拌した後、40℃程度の湯で加熱し10分間攪拌して、反応させた。反応後、沈澱により生成したDCCウレアを濾別し、濾液を減圧留去して溶媒を除いた。次いで、

(6)

10

1規定塩酸を加え、水相を酸性にし、塩化メチレンで3回抽出を行った。次いで、塩化メチレン相を濃縮した。

【0042】得られた濃縮液をシリカゲル吸着カラムクロマトグラフィーで精製した。溶出液として、クロロホルム-メタノール系を用い、クロロホルム100%からメタノールを5%刻みで増やすステップワイズ溶出を行った。1ステップ当たり、20mlずつ溶出させてこれを分取した。ベンジルアミドメチルアミドカブロン酸を含むフラクションを回収し、溶媒留去して、第3中間体であるベンジルアミドメチルアミドカブロン酸を収率85%で得た。この化合物は、 $^1\text{H-NMR}$, IR, MSスペクトルによる構造を確認した。

【0043】次に、3つ口の50ml丸底フラスコに、上記第3中間体150mg (0.34mmol) を入れ、フラスコ内の空気をアルゴンガスで置換した。次いで、エーテルを第3中間体が溶解するまで加えた。エーテルの添加量は約20mlとなった。次いで、塩酸ガスを導入し、薄相クロマトグラフィーにより第3中間体が消え新しいスポットが原点に現れるまで、塩酸ガスを導入し続けた。反応終了後、エーテルを減圧留去して、リンカーとして用いるアミノ-O-メチルアミドカブロン酸の塩酸塩を得た。この化合物は非常に不安定であるので、精製せずに次の反応に用いた。

【0044】③ハブテンとリンカーとの結合反応
アミノ-O-メチルアミドカブロン酸の塩酸塩(リンカー)100.3mg (0.3mmol) が残留している3つ口40ml丸底フラスコ内の空気をアルゴンガスで置換した。次いで、脱水ピリジンを0.6ml加えて、上記リンカーを溶解させた。次いで、室温で、ジベレリンA4誘導体100mgを脱水ピリジン0.1mlに溶解させた溶液を滴下した。次いで、50℃で、18時間攪拌して、反応させた。反応終了後、塩酸を加えて、反応を終了させた。次いで、酢酸エチルで3回抽出し、飽和食塩水で中性になるまで酢酸エチル相を洗浄した。得られた酢酸エチル抽出液を無水硫酸ナトリウムを加えて放置し、脱水した後、無水硫酸ナトリウムを濾別し、濾液を濃縮した。

【0045】濃縮液をシリカゲル吸着カラムクロマトグラフィーで精製した。溶出液として、クロロホルム-メタノール系を用い、クロロホルム100%からメタノールを5%刻みで増やすステップワイズ溶出を行った。1ステップ当たり20mlずつ溶出してこれを分取した。ジベレリンA4-N-O-メチルアミドカブロン酸を含むフラクションを回収し、溶媒留去して、ハブテンとリンカーとの結合体であるジベレリンA4-N-O-メチルアミドカブロン酸を収率15%で得た。この化合物は、 $^1\text{H-NMR}$, IR, MSスペクトルによる構造を確認した。

【0046】④結合部位の修飾
ジベレリンA4-N-O-メチルアミドカブロン酸4m

(7)

11

g ($8 \mu\text{mol}$) をジメチルスルホキシド $69 \mu\text{l}$ に溶解した。次いで、ジメチルスルホキシドを $100 \text{mg}/\text{ml}$ の濃度で溶解させたN-ヒドロキシサクシニイミド溶液を $9.2 \mu\text{l}$ ($8 \mu\text{mol}$) 加えた。次いで、ジシクロヘキシルカルボジイミド $1.8 \mu\text{l}$ ($8 \mu\text{mol}$) を加え、室温で一夜反応させた。析出したジシクロヘキシル尿素を濾過により除去した。反応生成物であるジベレリンA4-N-O-メチルアミドカプロン酸-N-ヒドロキシサクシニイミドエステルの反応液 $80 \mu\text{l}$ ($8 \mu\text{mol}$) を、5-アリルアミノ-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸-四ナトリウム塩 $1 \mu\text{mol}$ が溶解している 0.1M ほう酸ナトリウム溶液 ($\text{pH} 8.5$) 0.42ml に加え、室温で一夜放置した。これにより、目的物であるジベレリンA4-[15]-dUTPが、副生成物と共に生成した。

【0047】次に、上記反応混合物から目的物を分離した。目的物の分離は、高速イオン交換クロマトグラフィ用充填カラムにTSKゲルDEAE-2SW (東ソー) を充填した。溶出液として 0M から 0.7M の塩化ナトリウム溶液を用い、この塩化ナトリウム溶液の濃度を直線的に連続して 0M から 0.7M まで増加させた。

【0048】目的物のリテンションタイムは、主副生成物である5-アリルアミノ-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸よりも遅く、両者は明確に分離することができる。目的物の溶出濃度が最も高いフラクションを回収し、セファデックスG-10 (ファルマシア) によるゲル濾過により脱塩を行い、凍結、乾燥して、目的物の標識物質であるジベレリンA4-N-O-メチルアミドカプロン酸-[5-(アミドアリル)-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸]-四ナトリウム塩 (ジベレリンA4-[15]-dUTP) を得た。

表1

1スポットの λDNA量 (fg)	0	5	10	20	40	80	400	2000
ジベレリンA4- [15]-dUTP (本発明)	-	±	+	+	+	+	+	+
ディゴキシゲニン -11-dUTP (比較例)	-	-	-	-	+	+	+	+

【0054】

【発明の効果】本発明によれば、アイソトープ法の安全上の欠点を解消し、検出感度に優れた、核酸等の検出方法、並びに標識物質及び検出物質を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

12

* 【0049】 (5) λDNAの検出

ランダムプライムDNAラベリングキット (ベーリンガーマンハイム社) を用いて、λDNAを上記ジベレリンA4-[15]-dUTP (標識物質) により標識した。標識したλDNAをそれぞれニシン精子DNA $100 \text{ng}/\text{ml}$ を含むDNA希釈溶液により希釈した。図1に示すごとく、λDNA希釈液1を、ナイロンメンブレン2上にスポットし、紫外線照射によりDNAを固定した。希釈の際に、一定量の1スポットの中に、それぞれ0, 5, 10, 20, 40, 80, 400, 2000 fg (フェムトグラム) のλDNAが含まれるようにした。0 fgは、ブランクテストである。

【0050】次に、ナイロンメンブレンをブロッキング溶液に30分間浸した後、アルカリ性ホスファターゼ標識抗ジベレリンA4抗体 (検出物質) をそれぞれ結合させた。未結合の検出物質を洗浄により除去し、その後蛍光基質HNPP (アイシンコスモス研究所製) にて反応させた。反応後、励起光を照射して、λDNA希釈液のスポットより発する蛍光を検出した。

【0051】また、比較例として、上記ジベレリンA4-[15]-dUTPの代わりに、ディゴキシゲニン-11-dUTP (DIG-11-dUTP) を用いて、λDNAを同様の方法により検出した。

【0052】上記実験の結果を表1に示した。表1において、「+」は検出可能、「±」は検出不明瞭、「-」は検出不能を示す。同表より知られるごとく、ジベレリン標識λDNAは、10 fgという極微量でも十分に検出できた。これに対して、比較例のディゴキシゲニン標識λDNAは、40 fgまでしか検出できなかった。

【0053】

* 【表1】

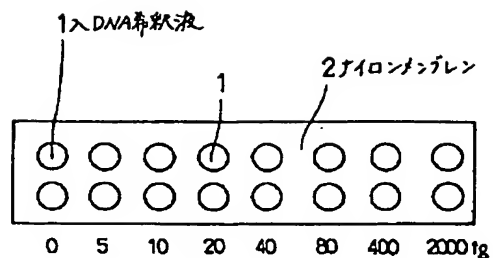
【図1】実施形態例における、λDNAの検出方法を示す説明図。

【符号の説明】

- 1... λDNA希釈液,
- 2... ナイロンメンブレン,

(8)

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 鍵山 直人
愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地 株式会
社アイシン・コスモス研究所内

(72)発明者 初山 政慶
愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地 株式会
社アイシン・コスモス研究所内

(72)発明者 近藤 恭光
愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地 株式会
社アイシン・コスモス研究所内

(72)発明者 西谷内 美穂
愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地 株式会
社アイシン・コスモス研究所内

(72)発明者 山田 幸生
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番
地の1 株式会社豊田中央研究所内

(72)発明者 浅見 修
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番
地の1 株式会社豊田中央研究所内

(72)発明者 杉山 英彦
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番
地の1 株式会社豊田中央研究所内